

Aus der Hautklinik/Andrologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Ärztlicher Leiter: Professor Dr. Hans-Wolfgang S p i e r

KONSERVIERBARKEIT VON HUMANSERMA
IN FLÜSSIGEM STICKSTOFF

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Wölke

aus Berlin

1973

Aus der Hautklinik/Andrologie

im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

Ärztlicher Leiter: Professor Dr. Hans-Wolfgang Spier

KONSERVIERBARKEIT VON HUMANSPERMA

IN FLÜSSIGEM STICKSTOFF

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Wölke

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. R. Kaden

Korreferent: Prof. Dr. Stüttgen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 10.12.1973

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Entwicklung der Kryospermeforschung	2
Historische Übersicht	2
Neuere Entwicklung	5
Grundsätzliche Betrachtungen	9
zur Humanspermakonservierung	
Zielesetzung	12
Material und Methodik	13
Eigene Untersuchungen	13
Ergebnisse	24
Teil I	27
Teil II	40
Teil III	41
Diskussion	43
Zusammenfassung	48
Literatur	49

Einleitung

In der Andrologie wird die Kryospermatologie langsam zu einem immer wesentlicheren Faktor. Ihre Aufgabe besteht darin, Sperma mit möglichst geringem Qualitätsverlust einzufrieren, für längere Zeit aufzubewahren und zum geeigneten Zeitpunkt wieder aufzutauen, um damit eine normale Konzeption zu ermöglichen.

Wenn ihre Rolle in der Fortpflanzungsbiologie auch heute noch relativ klein ist, so wird es doch bald zum Alltag gehören, daß Sperma kryobehandelt und in Samenbanken gelagert wird. Mantegazza schlug deren Schaffung schon 1866 vor, und heute gibt es außer in den USA, dem Vaterland der Kryospermaforschung, u. a. auch in Dänemark, Deutschland, England, Israel, Japan, Österreich und Schweden schon Samenbanken.

Ihre Aufgabe besteht darin, tiefgefrorenes Humansperma zu lagern:

1. Zur homologen Insemination:

- a) Um bei drohender Fertilitätsstörung prophylaktisch zu helfen: Bei gefährdeten Berufen, zur Erleichterung der freiwilligen Vasektomie, bei drohenden Tumoren und Entzündungen und bei umfassender Zytostatika- oder Röntgentherapie.
- b) Um an verschiedenen Orten lebenden Ehepartnern (Krieg, Gefangenschaft) ihren Kinderwunsch zu erfüllen.
- c) Um bei Oligospermie genügend Sperma für eine erfolgreiche Konzeption zu sammeln.

2. Zur heterologen Insemination:

Um den Kinderwunsch lediger Frauen oder den von Ehepartnern zu erfüllen, denen ein Kind auf andere Art versagt ist (Impotenz, Rhesus- oder Eiweißsensibilisierung).

Spermien wurden bisher schon unter vielerlei Bedingungen und mit unterschiedlichen Ergebnissen der Kryobehandlung unterzogen; diese Arbeit soll untersuchen, in welcher Form mehrere Faktoren auf das Sperma hinsichtlich seiner Qualität bei einer bestimmten Methodik der Kryobehandlung einwirken.

ENTWICKLUNG DER KRYOSPERMAFORSCHUNG

Historische Übersicht

Um eine Übersicht über die geschichtliche Entwicklung der Kryospermatologie zu geben, soll eine Form der Darstellung gewählt werden, bei der diese Entwicklung als Summe der für sie wichtigen Teilaspekte aufgezeigt wird. Aus der Vielzahl der Fakten sollen die wesentlichen ausgewählt und in chronologischer Reihenfolge aufgeführt werden: Angefangen bei den ersten Beobachtungen von Spallanzani, daß Spermien auch Kälte ertragen können, bis hin zu den mit Hilfe von Kryosperma gezeugten Kindern.

Da die Forschungsergebnisse der Veterinärmedizin nicht ohne weiteres auf Humansperma übertragen werden können, wird die Tier- getrennt von der Humanspermakonservierung erwähnt, obwohl ein wesentlicher innerer Zusammenhang in dieser Beziehung besteht.

Die gesamte Kryospermaentwicklung muß man außerdem zeitlich in zwei Abschnitte gliedern. Vor 1949 war es ohne geeignete Kryoprotektiva nicht möglich, Sperma mit befriedigendem Auftausergebnis einzufrieren - 1949 erfolgte die richtungweisende Entdeckung von Polge, Smith und Parkes, die darin besteht, daß Glycerin als Kryoprotektivum zu verwenden ist und Spermien in der Kälte stabilisiert; durch diese Entdeckung wurde es erst in nennenswertem Umfange ermöglicht, Sperma tiefzुकühlen und damit auch Konzeptionen zu erreichen.

A. Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin werden bis 1949 von mehreren Forschern noch lebende Spermien nach dem Einfrieren und Auftauen entdeckt; eine Verwendbarkeit des Spermias ist jedoch wegen der Schädigung durch die Kälte bis auf eine Ausnahme nicht möglich.

Nach 1949 geht die Entwicklung in der Veterinärmedizin schnell voran; Samenbanken sind alltäglich, und Tausende gesunder Tiere wurden bisher schon gezeugt.

1840 Prévost friert Froschsperma bei -8°C und -10°C kurz ein;

1853 Quatrefages friert Fischsperma bis -9°C 50 sek. lang ein;

1870 Schenk friert das Sperma mehrerer Tiere bis -9°C ein;

1938 Luyet und Hodapp frieren Froschsperma bei -196°C ein;

1941 Shaffner, Henderson und Card frieren Geflügelsperma bei -79°C 14 Monate lang ein;

1942 Shaffner friert Geflügelsperma bei -79°C eine Stunde lang ein und erzielt damit eine Befruchtung;

1949 Polge, Smith und Parkes entdecken die kryoprotektive Wirkung des Glycerins.

Es soll hier deutlich hervorgehoben werden, daß die Veterinärmedizin, besonders nach 1949, einen sehr großen Teil zur Entwicklung der Kryotechniken beigetragen hat. Viele Samenbanken sind eingerichtet, und bei Tausenden von Konzeptionen hat man festgestellt, daß durch die Verwendung kryokonservierten Spermias keine Zunahme körperlicher Anomalien stattgefunden hat.

Großen Teil daran haben u. a.:

1959 Meryman und Kefig;

1964 Mann;

1959 Deminatus;

1967 Rohloff;

1961 Forgason et al.;

1968 Schmidt;

1963 Herman und Madden;

1968 Wales und O'Shea.

Ihnen sind mehrere Verfahren zum Schutze des Spermias vor und während der Kryospermakonservierung zu verdanken.

B. Humanmedizin

Genau wie in der Veterinärmedizin wurde auch in der Humanmedizin vor 1949 ohne Effektivität geforscht; die Entdeckung des Glycerins war für das Humansperma vielleicht noch wesentlicher als für tierisches Sperma.

1776 Spallanzani friert Spermien bei 0 °C 30 min. lang ein;

1857 Godard, Davenport und Gellhorn sehen nach tieferem Einfrieren und Auftauen noch lebende Spermien;

1866 Mantegazza beobachtet die Physiologie der Spermien bis -15 °C; er ist der Schöpfer der Idee der Samenbanken.

1927 Pawlow friert Spermien bei -5 °C 11 Stunden lang ein;

1938 Jahnelt beobachtet bei einer Spirochätenuntersuchung nach Einfrieren bis -200 °C noch lebende Spermien. Er macht Gefrierversuche bei -75 °C, - 196 °C und - 269 °C und vermutet, daß die Einfriereschwindigkeit wichtig sei für die Überlebensqualität der Spermien.

1940 Shettles bestätigt Jahnelt; er bemerkt individuelle Unterschiede in der Spermienresistenz.

1942 Hoagland und Pincus stellen ein maximales Überleben der Spermien nach Behandeln mit flüssigem Stickstoff fest.

Polge, Smith und Parkes stellen 1949 die stabilisierende Wirkung des Glycerins dar: Mit dieser Entdeckung wurde der Grundstein für alle tierischen und menschlichen Samenbanken gelegt.

Die Konservierung tierischen Spermas mit Hilfe des Glycerins wurde sehr bald begonnen, während die Erforschung der Konservierung von Humansperma bis etwa 1953 vernachlässigt wurde.

Neuere Entwicklung

Von diesem Zeitpunkt an beginnt ein neues Kapitel in der Entwicklung der Kryospermaforschung.

Es werden einerseits Theorien und Beurteilungsmodi aufgestellt, die die Konservierungsmöglichkeiten beeinflussen, andererseits werden Techniken entwickelt, die die Konservierung verbessern und Geburten mit tiefgekühltem Sperma ermöglichen.

Des besseren Überblicks wegen sollen daher diese theoretischen Entwicklungen und die Praxis der Kryotechnik mit ihren Erfolgen getrennt aufgeführt werden.

a) Kryobiologische Entwicklung

1950 Blom bietet mit seiner "Eosin-Nigrosin"-Methode die Möglichkeit, lebende von toten Spermien unterscheiden zu können.

1952 Luyet erläutert seine Theorie von der Vitrification - der Möglichkeit, Eiskristallbildung in der Zelle durch ultraschnelles Einfrieren zu vermeiden.

1953 Sherman und Mitarbeiter frieren Spermien in flüssigem CO_2 bei -79°C ein; die 3-Monats-Überlebensrate beträgt bei ihnen etwa 67 %.

1954 Sherman und Bunge stellen fest: Kryokonserviertes Sperma kann eine Konzeption auslösen und eine normale Entwicklung induzieren;

Gründung der ersten Samenbank für Humansperma in Iowa City; Gründung einer Samenbank in Tokio;

1962 Sherman berichtet über eine neue Art der Samenkonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C ; er beschreibt, daß bei dieser Lagertemperatur keine lagerungsbedingten Motilitätsverluste auftreten sollen;

1963: Sherman berichtigt Luyet's Theorie: Sie ist auf Humansperma nicht anwendbar - bei menschlichen Spermien

erbringt eine reduzierte Einfriergeschwindigkeit, speziell im Bereich um 0 °C, eine deutlich günstigere Überlebensrate mit merklicher extrazellulärer und minimaler intrazellulärer Eisbildung.

1964 Mann entdeckt, daß bei zu starker Abkühlung oberhalb von 0 °C eine irreversible Schädigung der Zelloberfläche eintritt;

Hampel und Levan stellen Chromosomenbrüche in kälte-behandelten menschlichen Zellen fest;

Menkin et al. entdecken, daß nicht unbedingt eine Korrelation zwischen der Motilität und der Konzeptionsrate bestehen muß;

1966 Behrman und Sawada bestätigen Menkin, daß nicht in jedem Fall eine Korrelation zwischen Spermatozoendichte und -motilität mit der Möglichkeit bestehen muß, mit diesem Sperma eine Geburt zu induzieren;

1967 Ackerman berichtet über veränderte Stoffwechselbedingungen beim Kryosperma im Kälteschock (weiterhin darüber 1968 und 1971);

Sawada stellt fest, daß die Art des Auftauvorganges von tiefgefrorenem Sperma nur von geringem Einfluß ist auf die Qualität der Spermien;

Boyd schlägt bei Oligospermien das Sammeln des "Split-Ejakulates" vor, also das Sammeln des ersten Drittels des Ejakulates, das etwa 75 % aller Spermien enthält, und in dem die Morphologie und die Motilität am besten sind;

Sawada et al. propagieren die Methode des "slow freezing"; diese Methode zeigt günstigere Ergebnisse in Bezug auf die Überlebensrate und den Sauerstoffverbrauch der Kryokonservierten Spermien;

1968 Sawada und Ackerman berichten über die Wichtigkeit verschiedener Temperaturbereiche beim Abkühlen des Spermas (Kälte- bzw. Temperaturschock);

- 1969 Behrman und Ackerman ziehen zur Erklärung der unregelmäßigen Einfrier-Auftau-Ergebnisse einen genetisch determinierenden Faktor in Betracht;
- 1970 Der Deutsche Ärztetag widerruft den Beschluß des 62. Deutschen Ärztetages, auf dem es geheißen hatte, die heterologe Insemination werde aus sittlichen Gründen als wider die Ordnung der Ehe verstoßend abgelehnt;
- 1971 Sperling und Kaden berichten über Chromosomenuntersuchungen im menschlichen Ejakulat;
Cohen berichtet über die "Gefrierfähigkeit": nicht alle Ejakulate sind in gleichem Maße geeignet, eingefroren zu werden;
Pedersen und Lebech berichten über ultrastrukturelle Veränderungen von Spermien nach Kältebehandlung;
Schirren berichtet über eine einfache Methode zur Erkennung lebender und toter Spermien (nach Blom).
Tyler propagiert die Methode des "rapid freezing": Sie sei einfacher, zeitsparender und brächte eine ebenso gute Fertilisationsrate wie das "slow freezing".

b) Kryospermatologische Erfolge (Geburten)

- 1953 Sherman, Bunge, et al. berichten über ihre Einfrier-methode und ihre klinischen Erfolge;
- 1954 Bunge et al. berichten über normale kryoinduzierte Geburten;
- 1956 Keettel et al. berichten über normale Geburten: Bei 26 Inseminationen eine Geburtsrate von 34,5 %;
- 1958 Iizuka und Sawada berichten über normale Geburten;
- 1959 Sawada berichtet über normale Geburten;
- 1963 Sherman erzielt mit in flüssigem Stickstoff gelagerten Spermien eine normale Konzeption und Geburt;
- 1964 Perloff et al. berichten über 6 normale Geburten;
- 1966 Behrman und Sawada berichten über kryospermainduzierte Geburten; Geburtsrate bei 28 Inseminationen 42,9 %.

- 1969 Behrman und Ackerman berichten über normale Geburten:
Geburtsrate bei 68 Inseminationen 42,8 %;
Matheson et al. berichten über normale Geburten: Bei 7
Inseminationen beträgt die Geburtsrate 42,8 %;
1971 Tyler inseminiert 122 Patienten mit Sperma, das mit der
Methode des "rapid freezing" konserviert wurde, und
erzielt damit eine Geburtsrate von 70 %.

Während also von einigen Gruppen schon seit längerer Zeit Kryosperma zur Erzeugung von Schwangerschaften herangezogen wird, sind aufgrund vielfächeriger Erfahrungen - vor allem von der hiesigen andrologischen Arbeitsgruppe "Kryospermeforschung" (Kaden, Grossgebauer, Rohloff, Sokol, Sperling) - Bedenken angemeldet worden, so daß Kryospermainseminationen erst nach Ausschluß aller schädigender Möglichkeiten zur andrologischen und gynäkologischen Therapie freigegeben werden sollten.

GRUNDSÄTZLICHE BETRACHTUNGEN ZUR HUMANSPERMAKONSERVIERUNG

Das beste Kriterium für die Qualitätsbeurteilung einer Spermefraktion nach der Kryobehandlung wäre die Geburt eines vollkommen gesunden Kindes. Da dieses Kriterium wohl nur selten bei der reinen Forschung in Betracht zu ziehen ist, kommen als Parameter zur Qualitätsbeurteilung die folgenden in Frage:

Die Überlebensrate,
die Motilitätsqualität,
die Dauer der Motilität und
die Fruktolyse.

Unter der Überlebensrate versteht man die Anzahl von Spermien in Prozent, die nach der Kryospermakonservierung überlebt haben, im Verhältnis zu der Anzahl von Spermien in Prozent, die im Ejakulat lebten, also

$$\frac{\text{Anzahl lebender Spermien nach der Kryobehandlung}}{\text{Anzahl lebender Spermien vor der Kryobehandlung}} \times 100$$

Durch die "Eosin-Methode" sollen lebende von toten Spermien unterschieden werden; die lebenden beweglichen und unbeweglichen Spermien bleiben ungefärbt, während die toten Spermien den Farbstoff Eosin in sich aufnehmen, da sie an der Membran geschädigt sind.

Bei der Beurteilung der Motilitätsqualität beurteilt man die sich bewegenden Spermien entsprechend der vorherrschenden Qualität als lebhaft, mäßig, schwach (Kaden und Mortler 1970/71).

Die Messung der Motilitätsdauer erfolgt durch Untersuchungen in größerem Abstand; ihr kommt eine große Bedeutung zu, besonders bei geringer Spermiedichte ist sie der limitierende Faktor.

Die Fruktolyse ergibt einen biochemischen Anhalt für die Beurteilung der Spermienaktivität; ihr Anstieg geht parallel mit der Spermienaktivität.

Während diese Kriterien dazu dienen, die Qualitätsveränderung des Spermas nach dem Einfrieren zu beurteilen, haben sich im Laufe der Zeit kryobiologische Maßnahmen abgezeichnet, die dazu dienen, die Spermaqualität ohne erhebliche Einbuße zu erhalten. Die wichtigsten begünstigenden Faktoren für den Komplex der Kryospermakonservierung sind folgende:

Geeignetes Puffer-Nährmedium:

Die Spermien müssen in einem für sie physiologischen Milieu sein, das erlaubt, mit Glycerin oder anderen kryoprotektiven Substanzen durchtränkt zu werden. Menschliche Spermien brauchen für ihre Aktivität einen bestimmten pH-Bereich, sonst verfallen sie der Starre. Des weiteren verbrauchen sie Energie - wenn dieser Verbrauch auch während der Konservierung in höchstem Maße eingeschränkt ist. Pufferung und Ernährung müssen also gewährleistet sein, allerdings sollte die auf diese Weise eingetretene Verdünnung nicht das Verhältnis 1:5, Spermien : Lösung, überschreiten.

Kryoprotektivum:

Erst ein Schutzmittel ermöglicht es, Sperma tiefen Temperaturen auszusetzen - die protektiven Substanzen dürfen jedoch nicht mit der physiologischen Aktivität der Spermien interferieren. Bei der Humanspermakonservierung ist Glycerin essentiell, bei der Tierspermakonservierung kann es öfter durch andere Kryoprotektiva ersetzt werden. Di-Methyl-Sulf-Oxyd z. B. erweist sich bei manchen Tieren als besseres kryoprotektives Agens als Glycerin - für Humansperma jedoch ist es toxisch. Glycerin puffert und verhindert Eiweißdenaturierungen, es wirkt wasserbindend und verhindert oder verringert zumindest dadurch die intra- und extrazelluläre Eisbildung.

Kurzes Intervall zwischen Ejakulation und Einfrieren:

Es sollte ziemlich gering gehalten werden, damit die anfangs große Motilität der Spermien erhalten bleibt.

Vermeidung des Temperaturschocks:

Der Temperaturschock, d. h. eine durch zu schnelles Einfrieren der Spermien, oberhalb von 0 °C erfolgte irreversible Schädigung der Zelloberfläche muß vermieden werden, entweder durch entsprechend langsames Abkühlen oder auch durch eine entsprechende Vermehrung der Kryoprotektiva - beim Humansperma ist das erstere vorzuziehen.

Enthaltsamkeit von etwa 4 bis 7 Tagen:

Ein qualitativ gutes Sperma erhält man am besten nach einem enthaltsamen Intervall von 4 bis 7 Tagen - aus diesem Grunde sollte vor einer Kryokonservierung dieses Intervall möglichst eingehalten werden.

Um den Vorgang des Einfrierens von Sperma mit befriedigendem Ergebnis vornehmen zu können, wurden mehrere unterschiedliche Verfahren entwickelt.

Einerseits wurde das sog. "slow-freezing" entwickelt, bei dem die Spermien - besonders oberhalb des Gefrierpunktes - mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 °C pro Minute eingefroren werden.

Andererseits wurde das Verfahren des "rapid-freezing" benutzt, bei dem innerhalb kürzester Zeit sehr tiefe Temperaturen angestrebt werden. Die Einfriergeschwindigkeit liegt hier bei etwa 20 °C pro Minute.

Zuletzt entstanden noch die verschiedensten Variationen zwischen diesen beiden Möglichkeiten; die bei den folgenden Versuchen verwendete Einfriergeschwindigkeit liegt ebenfalls zwischen denen der erstgenannten Verfahren.

Da zudem festgestellt wurde, daß zwischen Motilitätsverlust und geringer Spermiedichte einerseits und hoher Konzeptionsrate andererseits keine direkte Beziehung zu herrschen braucht, werden die verschiedensten Einfriertechniken empfohlen und angewandt.

ZIELSETZUNG

In der Andrologie haben sich in Bezug auf die Ejakulatuntersuchungen gewisse Normalwerte durchgesetzt (Schirren 1970), nach denen man ein Ejakulat beurteilt.

Von diesen Normalwerten ausgehend soll diese Arbeit das Ziel verfolgen, herauszufinden, wie sich die Qualität des Spermas unter dem Einfluß bestimmender Faktoren bei einer bestimmten Methodik verhält. Als wesentliches Kriterium zur Beurteilung der Spermaqualität dient die Überlebensrate der Spermien nach der Kryobehandlung. Mit diesem Kriterium läßt sich allerdings nichts Definitives über die Konzeptions- oder die Fertilisationsfähigkeit eines Spermas aussagen, weshalb die Ergebnisse in dieser Hinsicht nur eine beschränkte Aussagekraft besitzen.

MATERIAL UND METHODIK

Eigene Untersuchungen

Die Ejakulate von 104 Patienten der andrologischen Sprechstunde des Klinikum Steglitz zwischen dem Sommer 1971 und dem Sommer 1972 wurden untersucht, tiefgefroren, aufgetaut und wieder untersucht, und zwar nach folgender Methode:

Das Ejakulat wird durch Masturbation - vorzugsweise in der Klinik - gewonnen und in einem sterilen Plastikdöschen gesammelt. Im Labor wird es in Meßzylinder umgegossen und sofort spermatologisch bestimmt. Volumen und pH - Wert werden gemessen, Besonderheiten in Farbe, Geruch und Konsistenz, sowie die genaue Zeit bis zur Verflüssigung werden notiert.

Die Werte werden entsprechend einem Spermioogrammformular (s. folgende Seite) gemessen und notiert.

Die Anzahl der Spermien in Millionen wird mikroskopisch in einer Zählkammer ermittelt, die anderen mikroskopischen Untersuchungen werden auf Objektträgern vorgenommen, teils als Vollnativpräparat, teils verdünnt oder auch angefärbt (Kaden und Mortler 1970 und 1971).

Die Initialfruktose und Fruktolyse werden nach folgendem Schema bestimmt:

In einem Wasserbad werden im Reagenzglas 8 ml Ejakulatansatz gemischt:

3,9 ml Aqua dest.

2,0 ml Zinksulfat

2,0 ml Natronlauge

0,1 ml Ejakulat

In diesem Wasserbad von 100 °C wird der Ansatz 2 Min. belassen; nach der Abkühlung wird er enteiweißt, indem man ihn durch einen Filter laufen läßt. In einem Wasserbad von 80 °C werden jetzt 10 ml enteiweißter Ejakulatansatz gemischt:

6,0 ml Salzsäure

2,0 ml Resorzinlösung

2,0 ml enteiweißtes Ejakulat

Name

Datum

Geburtsdatum

Persönlichkeitsnummer

Adresse

Spermiogramm

Datum

Tag		Monat		Jahr	
15	16	17	18	19	20

Zeit

Ort

Ejakulat

Verflüssig. Zeit

21	22

 min

Letzter Samenerguß vor

23	24	25

 Tagen

pH

26

Volumen

28	29

 ml

Besond. Beschaffenheit

Nativpräparat

Spermien

Anzahl

31	32	33

Mill/ml

35	36	37	38

 Mill/Total

Bewegliche Spermien

39	40

 %

nach 5 Stunden

41	42

 %

Qual. Motilität

lebhaft (1) mäßig (2) schwach (3)

Initial

43

nach 5 Stunden

44

Unverhältnismäßig verzögerte Fortbewegung Ja (1) Nein (2)

45

Differential-Spermiozytogramm

bei

ausgezählten Zellen in %

Normale

46	47

Spermatogonien

48	49

Abnorme

50	51

Spermatocyten

52	53

Jugendliche

54	55

Spermatiden

56	57

Senile

58	59

Restkörper

60	61

Degenerationsformen

62	63

Sonstiges Ja (1) Nein (2)

64

Spermaliquor

Initialfructose

65	66	67	68

µg/ml

Fructoseverbrauch nach 5 Stunden

69	70	71	72

µg/ml

nach 24 Stunden

73	74	75	76

µg/ml

Beurteilung

Der Ansatz färbt sich je nach Fruktosekonzentration mehr oder weniger rot; er wird 8 Min. in diesem Wasserbad belassen, 10 Min. lang abgekühlt und dann photometriert.

Vom frischen Ejakulat werden vorher eine oder mehrere Portionen zum Einfrieren entnommen - je 0,5 ml - und mit der gleichen Menge Kryoprotektivum vermischt (s. Abb.). Diese Portionen werden in sterile 1 ml-Tuberkulinspritzen aufgezogen, mit einem Plastikpfropfen verschlossen, mit Name und Datum beschriftet und zum Einfrieren bereitgelegt (s. Abb.).



Steriles Mischen in Impfbox
(Sokol)



Vorarbeiten vor Einfrieren
(Sokol)

Tuberkulinspritzen werden als Aufbewahrungsmedium deshalb gewählt, weil sie bei ihrem Fassungsvermögen sehr lang sind und nur einen relativ geringen Durchmesser besitzen. Dadurch wird gewährleistet, daß das ganze Volumen etwa zur selben Zeit gleichmäßig eingefroren wird.

Diese Vorarbeiten finden bei Raumtemperatur - etwa 20 °C - sta

Kryoprotektivum: (nach Behrman und Ackerman (1969))

1. Schutzkolloidbasis

20,0 ml frisches Eigelb

14,0 ml Glycerin

26,0 ml sol. Glucose 5 % (5,5 g auf 100 ml Kristallwasser)

ad 100,0 ml sol. Natr. citric. 2,9 %

2. Gebrauchsfertige Lösung

40,0 ml Schutzkolloidbasis

3,6 mg Penicillin G = 40 000 IE

20,0 mg Streptomycin

800,0 mg Glykokoll

Diese Lösung wird im Wasserbad auf 56 °C erwärmt und ihr ph-Wert wird auf 7,2 bis 7,4 eingestellt. Frisch zubereitet ist diese Lösung bei + 4°C eine Woche lang haltbar.

Eingefroren wurde mit Hilfe eines kryobiologischen Einfriergerätes nach Sokol (Schemazeichnung und Abb. s. folgende Seite). Die gefüllten Spritzen werden zusammen mit einem internen oder externen Temperaturfühler in einen durchlässigen Spritzenbehälter gestellt (Kanister), der in den N₂-Nebel eines mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälters hinabgelassen wird. Der Stickstoffspiegel in diesem Behälter geht bis 22 cm unter den oberen Rand; das Einfahren des Kanisters erfolgt bis 8 cm an diesen Spiegel.

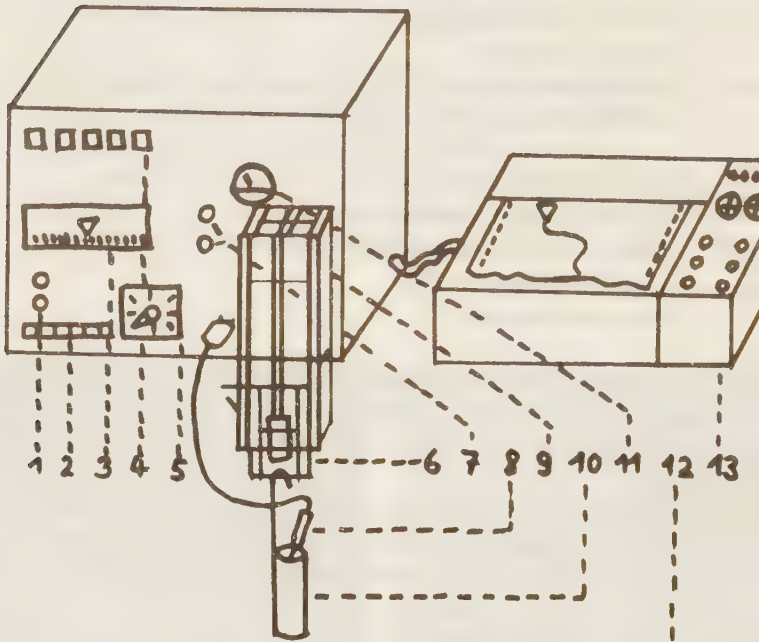
Darauf folgt ein Aufenthalt des in die Spritzen gefüllten Spermas für 8 Min im Stickstoffdampf im Inneren des Flüssigstickstoffbehälters; nach dieser Zeit erfolgt das vollständige Einfahren des Kanisters in den flüssigen Stickstoff.

Dazu Temperaturkurven A und B mit Erläuterungen, auf den folgenden Seiten.

Nach dem Erreichen der Lagertemperatur von - 196 °C werden die Spritzen in Lagerbehälter umgepackt, die vollständig mit flüssigem Stickstoff gefüllt sind. Dort verbleiben sie bis zum jeweiligen Auftauvorgang.

Dazu Temperaturkurve C mit Erläuterungen auf den folgenden Seiten.

Schema für kryobiologisches Einfriergerät nach K. Sokol



- 1) Hauptschalter
- 2) Automatik-Drucktesten
- 3) Temperaturanzeige
- 4) Kontrollleuchten
- 5) Schaltuhr
- 6) Haltebügel
- 7) Stellknöpfe für Temperaturbereich
- 8) Temperaturfühler
- 9) Einfahreautomatik
- 10) Kanister für Kryospermaspritzen
- 11) Voltmeter
- 12) Flüssigstickstoffbehälter
- 13) Kompensograph (elektr. Temperaturschreiber)

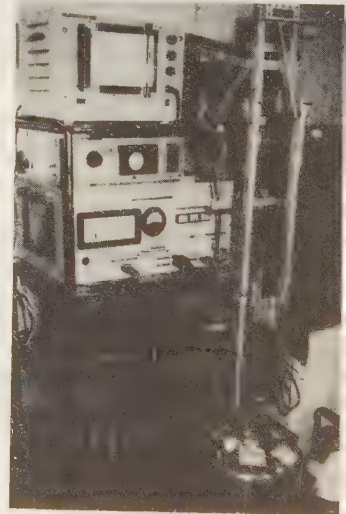


Abb. der Einfrieranlage (Soko)

Nach dieser Konservierung - hier im Mittel 54 Tage - wird das Sperma in den Spritzen mittels eines Wasserbades von 37 °C innerhalb von 3 bis 5 Min aufgetaut.

Dazu Temperaturkurve D mit Erläuterungen auf den folgenden Seiten.

Nach vollendetem Auftauen erfolgen die weiteren Untersuchungen in gleicher Weise wie vorher; die Ergebnisse werden entsprechend dem oben gezeigten Spermogramm aufgezeichnet.



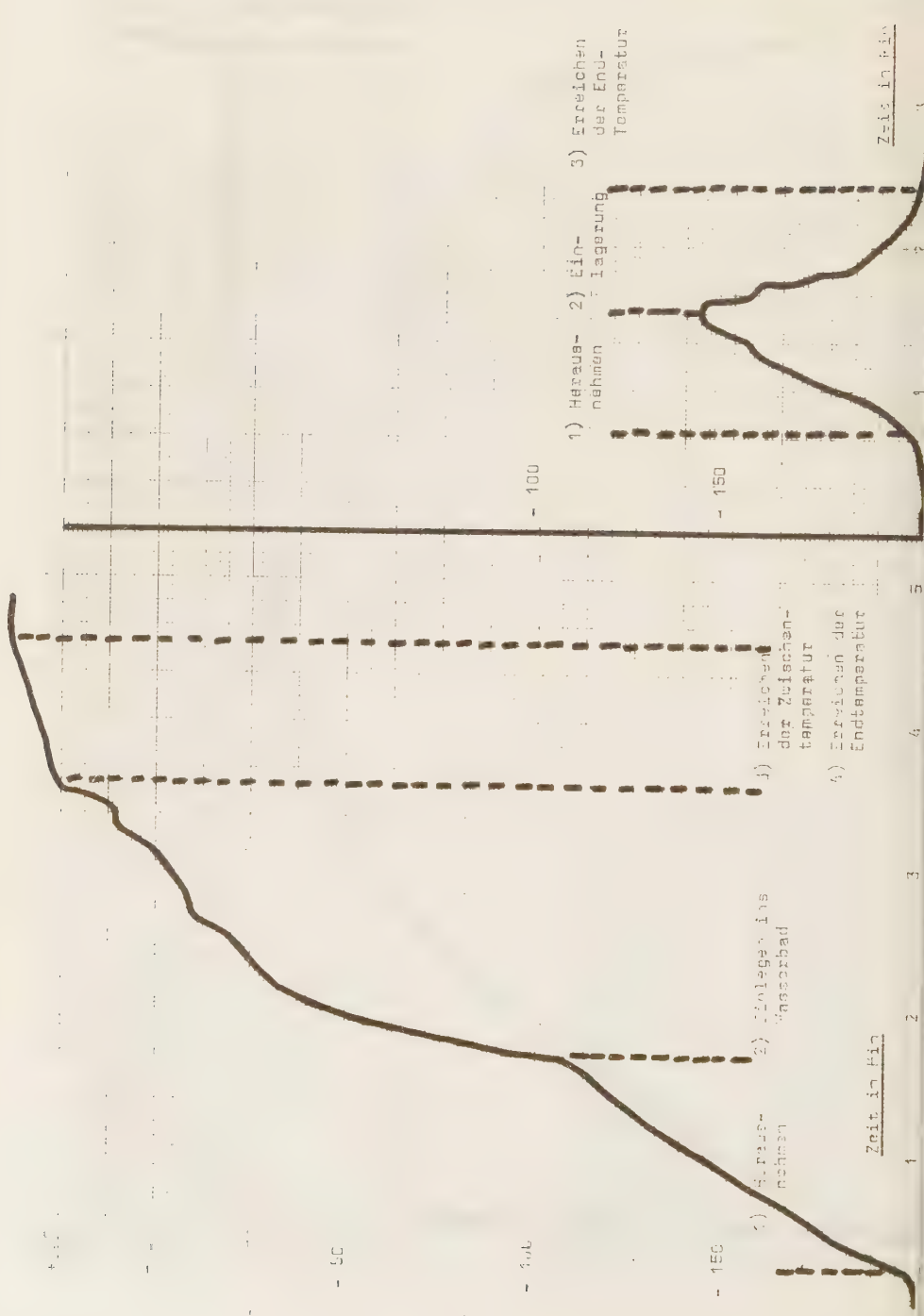


Elevation in feet
1,333 ft. Station

2.41 to 11.3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

- 1.0
- 170



Erläuterungen zu Temperaturkurve A:

Veränderungen der Spermtemperatur während des Einfrierens, gemessen innerhalb des einzufrierenden Mediums

1. Einführen des Temperaturfühlers in das Kryosperma;
Einfahren der Spritzen in den Stickstoffdampf; Verweilen des Spermas im Stickstoffdampf - 8 cm oberhalb des Stickstoffspiegels - innerhalb des Behälters, dabei etwa gleichmäßiger Temperaturabfall innerhalb 8 Min Verweildauer.
2. Einfahren der Spritzen in den flüssigen Stickstoff.
3. Nach etwa einer Minute erfolgt die Angleichung der Temperatur an die des flüssigen Stickstoffs.

Temperaturveränderungen insgesamt zwischen $+20^{\circ}\text{C}$ und -196°C . Die Temperaturzacke, die nach mehreren Autoren - z.B. Sokol - im Bereich von etwa -20°C infolge der Kristallisationswärme auftreten soll, konnte bei diesen Untersuchungen nicht gefunden werden - wohl nur bei hochsensibler Elektronik.

Erläuterungen zu Temperaturkurve B:

Veränderungen der Spermtemperatur während des Einfrierens, gemessen mit einem externen Temperaturfühler.

Mit dieser Methode wurden anfangs die Messungen kontrolliert; sie ist - wie zu ersehen - zur Messung der tatsächlichen Temperatur des Gefrierergutes nur mit Einschränkung zu verwenden.

1. Einlegen des Temperaturfühlers in den Kanister neben die gefüllten Spritzen; Einfahren der Spritzen in den Stickstoffdampf, dabei ziemlich unregelmäßiger Temperaturabfall innerhalb 8 Min Verweildauer.
2. Einfahren der Spritzen in den flüssigen Stickstoff;
3. Das Angleichen der Temperatur an die des flüssigen Stickstoffs erfolgt etwa ohne Verzögerung.

Temperaturveränderungen insgesamt zwischen $+20^{\circ}\text{C}$ und -196°C .

Erläuterungen zu Temperaturkurve C:

Veränderungen der Spermatemperatur während des Umpackens vom Einfrierbehälter in den endgültigen Lagerungsbehälter, gemessen innerhalb des eingefrorenen Mediums.

1. Herausnahme des Kanisters aus dem Einfrierbehälter und Umpacken der Spritzen mittels einer Kornzange;
Zeitdauer etwa 1 Min von der Herausnahme bis zum
2. Einlagern in den Lagerungsbehälter
3. Erreichen der endgültigen Lagertemperatur erfolgt wieder etwa innerhalb einer Minute.

Temperaturveränderungen insgesamt zwischen Lagertemperatur -196°C , -140°C und wieder -196°C .

Erläuterungen zu Temperaturkurve D:

Veränderungen der Spermatemperatur während des Auftauens, gemessen innerhalb des eingefrorenen Mediums

1. Herausnahme des Kanisters und Entnahme der Spritzen mittels einer Kornzange;
Etwa 1 Min. nimmt die Identifikation der entnommenen Kryospermprobe in Anspruch.
2. Einlegen der Spritzen in ein Wasserbad von $+37^{\circ}\text{C}$.
3. Nach etwa 2 Min. Verweildauer im Wasserbad ist eine Temperatur von 25°C erreicht; von dieser Temperatur an erfolgt ein sehr viel langsames Auftauen.
4. Erreichen der gewünschten Endtemperatur von $+37^{\circ}\text{C}$ etwa 5 Min nach dem Herausnehmen.

Temperaturveränderungen insgesamt zwischen Lagertemperatur -196°C und $+37^{\circ}\text{C}$.

ERGEBNISSE

Die Qualität eines Spermas - das eigentliche Kriterium für die Güte einer bestimmten Einfriertechnik - kann eigentlich nur bestimmt werden durch die Geburt eines genetisch vollkommen gesunden Kindes.

Da für diese Arbeit diese Art von Kriterium nicht anwendbar war, wurde als Parameter für die Spermaqualität nach dem Einfrieren in erster Linie die Überlebensrate der Spermien gewählt. Mit Hilfe dieses Kriteriums kann natürlich nur eine beschränkte Aussage über die Qualität eines Ejakulates gegeben werden - eine vollkommene Möglichkeit, die Gefrier- und Fertilisationsfähigkeit eines Spermas zu bestimmen, existiert leider noch nicht.

Es soll gleich zu Beginn erwähnt werden, daß die mit einer so geringen Patientenzahl erreichten Aussagen wohl keine statistische Signifikanz besitzen - als anregende und vielleicht wegweisende Untersuchungen für weitere Forschungen gedacht beinhalten diese Untersuchungen doch eine gewisse Aussage.

Um einen Ausgangspunkt für die Untersuchungen zu bilden, wurden diejenigen der sog. andrologischen Normalwerte gewählt, an Hand derer untersucht werden sollte, ob ein wesentlicher Zusammenhang zwischen ihnen und der Qualität des Spermas nach dem Einfrieren besteht.

Diesen Normalwerten wurden die entsprechenden Ejakulate der 104 Patienten zugeordnet, die unteren und oberen Grenzwerte aufgezeichnet und der arithmetische Mittelwert für die jeweilige Fraktion bestimmt.

Aus diesen Werten besteht die Tabelle 1, die auf den folgenden Seiten zu sehen ist; die dabei erwähnte Angabe "ohne 0" bedeutet: Diese Werte wurden gewonnen, ohne diejenigen Spermafraktionen zu werten, deren Überlebensrate nach 5 Std. schon 0 % beträgt.

Diese Aufstellung der Mittelwerte der untersuchten Ejakulatfraktionen zeigt bis auf die Werte der Fruktolyse allgemein eine ungefähre Übereinstimmung mit den Normalwerten.

Tabelle 1: Summarische Spezifizierung der untersuchten Kryospermaproben

Untersuchte Fraktion	Anzahl Ejakulate	Mittelwert	Grenzwerte		Bemerkungen
			Minimum	Maximum	
1) Verflüssigungszeit	104	16 Min	bei Erhalt	30 Min	9 unvollständig 12 bei Erhalt
2) enthaltene Tage	104	6 Tage	2 Tage	120 Tage	19 ohne Angabe
3) ph - Wert	104	7,27	6,9	8,0	
4) Volumen	104	4,4 ml	0,4 ml	8,7 ml	
5) Spermienmenge/ml	104	40,37 Mill	1000	132 Mill	
6) " total	104	177,63 "	500	730 Mill	
7) bewegl. Spermien in %	104	41,51 %	4,0 %	84,0 %	
	96 ohne 0	53,11 %	17,0 %	84,0 %	
8) wie 7), nach 5 Std.	104	37,90 %	0	82,0 %	
	96 "	41,50 %	4,0 %	82,0 %	
9) wie 7), nach Auftauen	104	14,05 %	0	63,0 %	
	96 "	15,06 %	1,0 %	63,0 %	
10) wie 8), nach Auftauen	104	5,76 %	0	36,0 %	
	96 "	6,30 %	0	36,0 %	
11) Qualität Motilität	104	1,48	1	3	
	96 "	1,28	1	3	
12) wie 11) nach 5 Std.	96 "	1,62	1	3	Beurteilungen für
13) wie 11) nach Auftauen	96 "	2,17	1	3	11) bis 14): lebhaft 1
14) wie 12) nach Auftauen	96 "	2,54	1	3	mäßig 2
15) Diff.-Sp.-Cytogramm	104				schlecht 3
					25 normal
					79 pathologisch

Tabelle 1

Untersuchte Fraktion	Anzahl Ejakulate	Mittelwert	Grenzwerte		Bemerkungen
			Minimum	Maximum	
18) Initialfruktose	104	3008 y/ml	430 y/ml	7490 y/ml	
17) Fruktolyse n. 5 Std.	104	214 y/ml	+310 y/ml	1960 y/ml	+ bedeutet Zunahme der Fruktose
18) Fruktolyse n. 24 "	104	627 y/ml	+510 y/ml	2460 y/ml	
19) wie 16) n. Auftauen	104	1749 y/ml	116 y/ml	4850 y/ml	(x)
20) wie 17) n. Auftauen	104	70 y/ml	+680 y/ml	1078 y/ml	
21) wie 18) n. Auftauen	104	142 y/ml	+671 y/ml	1665 y/ml	
22) Patientenalter	104	35 Jahre	20 J.	64 J.	
23) Zeit eingetoren	104	54 Tage	1 Std.	160 Tage	
24) Zeit bis Einfrieren	104	89 Min	30 Min	180 Min	

Angabe der wichtigsten "Andrologischen Normalwerte" (Schirren und Kaden):

- 1) Verflüssigungszeit: 15 - 20 Min
- 2) Enthaltsamkeit: 4 - 7 Tage
- 3) ph-Wert: 7,0 - 7,8
- 4) Volumen: 2,0 - 6,0 ml
- 5) Anzahl der Spermien: mehr als 40 Mill/ml
total mehr als 80 Mill
- 7) Bewegl. Spermien in %: mehr als 40 %
- 11) Motilität: vorwiegend lebhaft; Bewegungs-
exkursion
- 15) Differentialpermioctogramm: mehr als
60 % normal, weniger als 18 % senil und
jugendlich
- 16) Initialfruktose: mehr als 1200 y/ml
- 17) Fruktolyse nach 5 Std.: etwa 600 y/ml
- 24) Zeit bis Einfrieren: maximal 30 Min

(x): Man hätte einen niederen Wert vermutet, die Experimente haben diesen jedoch nicht bestätigt; es würde den Rahmen der Arbeit sprengen, eine Erklärung dafür anzugeben (Umwandlung von Glukose in Fruktose, Spermioolyse?)

Teil I

Die vorstehenden Kriterien - aufgeteilt in normale und in davon abweichende Werte - dienen für diese Arbeit als bestimmende Faktoren für die Qualität der entsprechenden Spermafractionen.

Bei ihnen wurden bestimmt:

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| a) Die Überlebensrate | Im Verhältnis zu den |
| nach dem Auftauen | sofort nach der |
| b) die 5 Std.-Überlebensrate | Ejakulation lebenden |
| c) die Überlebensrate | Spermien |
| 5 Std. nach dem Auftauen | |
| d) die Überlebensrate | im Verhältnis zu denen, die |
| 5 Std. nach dem Auftauen | nach dem Auftauen leben |

Jeweilige Angabe der unteren und oberen Grenzwerte

Hinter den jeweiligen Fraktionen - unter a) bis d) - Angabe der entsprechenden Überlebensraten

Am Anfang soll zum besseren Vergleichen für die einzelnen Fraktionen der Tabelle 2 eine Gesamtrechnung aufgeführt werden:

104 Patienten	a) 28,4 %	b) 78,3 %	c) 11,7 %	d) 41,4 %
davon 96 ohne 0	a) 33,9 %	b) 91,3 %	c) 13,9 %	d) 41,0 %

Die Angabe "Ohne 0" bedeutet: Dieser Wert wurde gewonnen, ohne diejenigen Spermafractionen zu werten, deren Überlebensrate nach 5 Std. schon 0 % beträgt.

Tabelle 2: Aufgliederung der Überlebensraten und Zuordnung zu den jeweiligen gegliederten Fraktionen

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer
1) Verflüssigungszeit			
	weniger als 15 Min		
a) 44	22,95 %	0	62,1 %
39 ohne 0	26,73 %	2,6 %	62,1 %
b) 44	84,35 %	0	98,0 %
39 ohne 0	89,52 %	23,4 %	98,0 %
c) 44	9,52 %	0	40,3 %
39 ohne 0	11,81 %	1,9 %	40,3 %
d) 44	38,81 %	0	100,0 %
39 ohne 0	41,62 %	1,1 %	100,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
zwischen 15 und 20 Min			

a) 28	30,16 %	0	79,4 %
27 ohne 0	31,23 %	4,8 %	79,4 %
b) 28	61,95 %	0	98,0 %
27 ohne 0	63,32 %	24,3 %	98,0 %
c) 28	11,16 %	0	37,5 %
27 ohne 0	12,35 %	1,2 %	37,5 %
d) 28	39,61 %	0	100,0 %
27 ohne 0	44,83 %	13,0 %	100,0 %

mehr als 20 Min

a) 32	31,89 %	0	89,0 %
30 ohne 0	32,73 %	3,1 %	89,0 %
b) 32	80,82 %	0	96,0 %
30 ohne 0	82,13 %	29,2 %	96,0 %
c) 32	15,33 %	0	58,3 %
30 ohne 0	16,14 %	2,6 %	58,3 %
d) 32	49,86 %	0	100,0 %
30 ohne 0	48,14 %	25,3 %	100,0 %

2) Enthaltssame Zeit

weniger als 4 Tage

a) 13	31,85 %	0	95,0 %
12 ohne 0	34,74 %	4,8 %	95,0 %
b) 13	66,32 %	0	96,3 %
12 ohne 0	68,04 %	24,3 %	96,3 %
c) 13	16,02 %	0	58,2 %
12 ohne 0	17,32 %	2,1 %	58,2 %
d) 13	55,44 %	0	100,0 %
12 ohne 0	52,73 %	25,2 %	100,0 %

zwischen 4 und 7 Tagen

a) 58	28,15 %	0	89,5 %
55 ohne 0	29,47 %	3,1 %	89,5 %
b) 58	80,37 %	0	100,0 %
55 ohne 0	84,63 %	23,1 %	100,0 %
c) 58	11,62 %	0	32,4 %
55 ohne 0	13,57 %	4,6 %	32,4 %
d) 58	42,14 %	0	100,0 %
55 ohne 0	40,22 %	18,2 %	100,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
mehr als 7 Tage			
a) 14	18,93 %	1,9 %	55,0 %
b) 14	74,36 %	40,4 %	95,6 %
c) 14	6,45 %	2,1 %	15,6 %
d) 14	46,06 %	9,2 %	100,0 %
3) ph-Wert			
normal 7,0 - 7,8			
a) 102	28,45 %	0	100,0 %
94 ohne 0	30,98 %	2,1 %	100,0 %
abweichend			
a) 2	35,75 %	0,8 %	70,7 %
4) Ejaculatvolumen			
Es gelten die gleichen Werte wie beim ph-Wert; die restlichen Werte wurden weggelassen (b) bis d)).			
5) Spermaqualität			
Normospermie, mehr als 40 Mill/ml			
a) 47	31,03 %	1,9 %	90,0 %
b) 47	95,22 %	23,5 %	100,0 %
c) 47	13,98 %	0	68,5 %
d) 47	45,01 %	0	100,0 %
Hypospermie, 20 bis 40 Mill/ml			
a) 19	29,25 %	2,6 %	88,7 %
b) 19	72,02 %	40,0 %	98,0 %
c) 19	13,36 %	0	53,0 %
d) 19	45,74 %	0	100,0 %
Oligospermie I, 10 bis 20 Mill/ml			
a) 11	16,77	7,7 %	36,0 %
b) 11	69,40 %	28,0 %	100,0 %
c) 11	6,35 %	0	20,7 %
d) 11	38,01 %	0	100,0 %
Oligospermie II, 1 bis 10 Mill/ml			
a) 26	26,21 %	0	95,0 %
23 ohne 0	32,04 %	11,1 %	95,0 %
b) 26	59,75 %	0	94,5 %
23 ohne 0	72,93 %	23,5 %	94,5 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer
c) 26	13,28 %	0	58,0 %
23 ohne 0	16,94 %	1,7 %	58,0 %
d) 26	50,40 %	0	100,0 %
23 ohne 0	52,90 %	12,5 %	100,0 %

Azoospermie, nur Zellen der Reifungsreihe

a) 1	0	0	0
b) 1	0	0	0
c) 1	0	0	0
d) 1	0	0	0

Aspermie, keine Spermien und Zellen

keine Person

6) Anzahl Spermien total

mehr als 120 Mill

a) 59	30,38 %	2,0 %	90,0 %
b) 59	91,01 %	23,5 %	100,0 %
c) 59	13,90 %	0	68,5 %
d) 59	44,86 %	0	100,0 %

zwischen 50 und 120 Mill

a) 16	18,15 %	3,1 %	42,4 %
b) 16	69,77 %	28,0 %	98,5 %
c) 16	9,20 %	0	27,0 %
d) 16	50,50 %	0	100,0 %

weniger als 50 Mill

a) 29	24,33 %	0	95,0 %
21 ohne 0	33,45 %	9,6 %	95,0 %
b) 29	52,78 %	0	100,0 %
21 ohne 0	72,89 %	23,5 %	100,0 %
c) 29	11,78 %	0	58,0 %
21 ohne 0	16,40 %	0	58,0 %
d) 29	48,40 %	0	100,0 %
21 ohne 0	49,30 %	0	100,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer
7) Bewegliche Spermien			
mehr als 40 %			
a) 74	28,22 %	3,1 %	89,0 %
b) 74	79,46 %	28,5 %	100,0 %
c) 74	15,51 %	0	68,5 %
d) 74	42,22 %	0	100,0 %
weniger als 40 %			
a) 30	24,59 %	0	95,0 %
22 ohne 0	30,75 %	2,6 %	95,0 %
b) 30	53,92 %	0	95,4 %
22 ohne 0	67,98 %	23,5 %	95,4 %
c) 30	9,77 %	0	58,0 %
22 ohne 0	12,32 %	2,6 %	58,0 %
d) 30	48,04 %	0	100,0 %
22 ohne 0	42,40 %	0	100,0 %
8), 9), 10) sind entsprechend durch 12), 13) und 14) ausgedrückt. Bei ihnen fallen jeweils alle "ohne 0"-Werte unter die Rubrik "schlechte Motilitätsqualität"; um ein klareres Bild zu geben, worden nur bei a) alle Werte mit aufgeführt.			
11) Qualität Motilität			
lebhaft			
a) 73	29,00 %	3,1 %	90,0 %
b) 73	79,23 %	49,2 %	98,5 %
c) 73	18,74 %	0	58,5 %
d) 73	47,28 %	0	100,0 %
mäßig			
a) 19	32,48 %	4,7 %	95,0 %
b) 19	59,00 %	24,3 %	97,4 %
c) 19	11,92 %	0	58,0 %
d) 19	36,69 %	0	100,0 %
schlecht			
a) 12	8,22 %	0	97,4 %
4 ohne 0	24,35 %	0	97,4 %
b) 12	25,00 %	0	100,0 %
4 ohne 0	78,34 %	33,3 %	100,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer
c) 12	5,60 %	0	69,4 %
4 ohne 0	17,35 %	0	69,4 %
d) 12	69,20 %	0	100,0 %
4 ohne 0	71,25 %	0	100,0 %

12) Qualität Motilität nach 5 Std.

lebhaft

a) 53	31,96 %	1,9 %	90,0 %
b) 53	85,24 %	51,2 %	98,4 %
c) 53	14,95 %	1,2 %	68,5 %
d) 53	46,77 %	0	100,0 %

mäßig

a) 30	22,85 %	3,1 %	65,0 %
b) 30	64,17 %	24,3 %	95,0 %
c) 30	9,16 %	0	29,4 %
d) 30	40,08 %	0	100,0 %

schlecht

a) 21	17,46 %	0	77,5 %
13 ohne 0	28,06 %	8,3 %	77,5 %
b) 13 ohne 0	70,14 %	16,8 %	100,0 %
c) 13 ohne 0	16,15 %	0	58,0 %
d) 13 ohne 0	57,55 %	0	100,0 %

13) Qualität Motilität nach Auftauen

lebhaft

a) 13	49,73 %	21,9 %	86,7 %
b) 13	88,93 %	69,8 %	100,0 %
c) 13	27,35 %	9,7 %	53,0 %
d) 13	54,99 %	0	100,0 %

mäßig

a) 45	30,17 %	3,1 %	90,0 %
b) 45	68,87 %	58,5 %	100,0 %
c) 45	14,36 %	0	68,5 %
d) 45	46,76 %	0	100,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
		schlecht	
a) 46	16,34 %	0	78,3 %
38 ohne 0	19,83 %	1,9 %	78,3 %
b) 38 ohne 0	76,38 %	56,3 %	95,6 %
c) 38 ohne 0	7,73	0	39,3 %
d) 38 ohne 0	38,98 %	0	100,0 %

14) Qualität Motilität 5 Std. nach Auftauen

		lebhaft	
a) 8	49,11 %	21,9 %	86,7 %
b) 8	90,83 %	78,6 %	100,0 %
c) 8	33,42 %	24,4 %	53,0 %
d) 8	68,01 %	4,0 %	95,0 %

		mäßig	
a) 30	30,46 %	8,2 %	95,0 %
b) 30	77,54 %	49,4 %	100,0 %
c) 30	19,84 %	1,2 %	68,5 %
d) 30	20,32 %	18,4 %	100,0 %

		schlecht	
a) 66	21,09 %	0	79,4 %
58 ohne 0	24,32 %	1,2 %	79,4 %
b) 58 ohne 0	76,75 %	42,6 %	98,7 %
c) 58 ohne 0	8,18 %	0	39,3 %
d) 58 ohne 0	33,63 %	0	100,0 %

15) Differentialspermiocytoogramm

		normal	
a) 28	26,22 %	4,0 %	86,7 %
b) 28	80,86 %	51,2 %	100,0 %
c) 28	9,78 %	1,5 %	53,0 %
d) 28	37,74 %	5,9 %	69,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
	pathologisch verändert		
a) 76	27,06 %	0	95,0 %
68 ohne 0	30,78 %	1,9 %	95,0 %
b) 76	64,97 %	0,9 %	100,0 %
68 ohne 0	74,40 %	1,0 %	100,0 %
c) 76	13,20 %	0	68,5 %
68 ohne 0	15,12 %	0	68,5 %
d) 76	45,50 %	0	100,0 %
68 ohne 0	48,50 %	0	100,0 %

16) Initialfruktose

mehr als 120 y/ml

a) 96	23,35 %	0	89,1 %
89 ohne 0	24,95 %	2,6 %	89,1 %
b) 96	84,25 %	0	100,0 %
89 ohne 0	85,05 %	54,8 %	100,0 %
c) 96	8,62 %	0	18,8 %
89 ohne 0	9,48 %	2,2 %	18,8 %
d) 96	28,35 %	0	100,0 %
89 ohne 0	26,26 %	0	100,0 %

viel weniger als 1200 y/ml

a) 8	41,30 %	8,2 %	90,0 %
b) 8	82,23 %	53,0 %	100,0 %
c) 8	11,41 %	1,0 %	18,8 %
d) 8	36,38 %	46,3 %	100,0 %

17) Fruktolyse in 5 Std.

etwa 600 y/ml

a) 13	32,56 %	7,1 %	89,0 %
b) 13	86,07 %	68,0 %	100,0 %
c) 13	15,62 %	2,2 %	47,0 %
d) 13	48,73 %	14,5 %	100,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer
		viel weniger als 600 y/ml	
a) 88	25,76 %	0	95,0 %
81 ohne 0	27,95 %	1,9 %	95,0 %
b) 88	77,92 %	0	94,6 %
81 ohne 0	80,04 %	49,3 %	94,6 %
c) 88	12,15 %	0	63,5 %
81 ohne 0	14,27 %	2,2 %	63,5 %
d) 88	48,78 %	0	100,0 %
81 ohne 0	51,59 %	23,2 %	100,0 %

		viel mehr als 600 y/ml	
a) 3	19,73 %	0	32,7 %
2 ohne 0	29,60 %	26,5 %	32,7 %
b) 3	53,74 %	0	96,6 %
2 ohne 0	82,43 %	53,9 %	96,6 %
c) 3	8,64 %	0	21,3 %
2 ohne 0	12,31 %	2,2 %	21,3 %
d) 3	43,72 %	0	100,0 %
2 ohne 0	41,28 %	16,3 %	100,0 %

18) Fruktolyse in 24 Std.

		weniger als 600 y/ml bzw. Anstieg	
a) 55	22,66 %	0	86,7 %
50 ohne 0	25,18 %	1,9 %	86,7 %
b) 55	74,92 %	0	89,4 %
50 ohne 0	78,45 %	42,3 %	89,4 %
c) 55	10,86 %	0	41,7 %
50 ohne 0	12,52 %	2,2 %	41,7 %
d) 55	47,88 %	0	100,0 %
50 ohne 0	46,61 %	28,3 %	100,0 %

		etwa, bzw. mehr als 600 y/ml	
a) 49	31,57 %	0	90,0 %
46 ohne 0	32,29 %	2,6 %	90,0 %
b) 49	88,86 %	0	100,0 %
46 ohne 0	90,24 %	38,5 %	100,0 %

Tabells 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
		etwa, bzw. mehr als 600 y/ml	
c) 49	12,62 %	0	32,3 %
46 ohne 0	13,84 %	2,2 %	32,3 %
d) 49	40,46 %	0	100,0 %
46 ohne 0	41,78 %	26,5 %	100,0 %

19) Initialfruktose nach Auftauen

		Absinken um mehr als 1000 y/ml	
a) 75	24,05 %	0	89,0 %
68 ohne 0	26,52 %	1,9 %	89,0 %
b) 75	85,74 %	0	100,0 %
68 ohne 0	88,63 %	31,4 %	100,0 %
c) 75	10,35 %	0	53,0 %
68 ohne 0	12,83 %	1,5 %	53,0 %
d) 75	41,87 %	0	100,0 %
68 ohne 0	48,12 %	23,2 %	100,0 %

		um weniger als 1000 y/ml	
a) 29	32,37 %	0	95,0 %
28 ohne 0	33,35 %	4,7 %	95,0 %
b) 29	81,87 %	0	99,6 %
28 ohne 0	83,05 %	25,7 %	99,6 %
c) 29	13,03 %	0	36,6 %
28 ohne 0	13,42 %	5,4 %	36,6 %
d) 29	40,05 %	0	100,0 %
28 ohne 0	40,07 %	18,5 %	100,0 %

20) Fruktolyse 5 Std. nach dem Auftauen

		keine Fruktolyse oder Anstieg	
a) 40	26,27 %	0	89,0 %
35 ohne 0	29,64 %	2,6 %	89,0 %
b) 40	63,52 %	0	100,0 %
35 ohne 0	72,10 %	23,5 %	100,0 %
c) 40	10,02 %	0	58,0 %
35 ohne 0	11,38 %	0	58,0 %
d) 40	37,40 %	0	95,0 %
35 ohne 0	38,39 %	0	95,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer
---------------	------------	-------------------	--------

etwa 600 y/ml

a) 11	39,16 %	7,7 %	86,7 %
b) 11	73,06 %	28,0 %	94,5 %
c) 11	14,67 %	0	52,0 %
d) 11	37,00 %	16,0 %	100,0 %

0 bis 400 y/ml

a) 52	26,46 %	0	90,0 %
49 ohne 0	28,64 %	1,9 %	90,0 %
b) 52	73,90 %	0	100,0 %
49 ohne 0	78,08 %	23,5 %	100,0 %
c) 52	13,62 %	0	68,5 %
49 ohne 0	14,40 %	1,2 %	68,5 %
d) 52	50,46 %	0	100,0 %
49 ohne 0	50,59 %	16,8 %	100,0 %

viel mehr als 600 y/ml

a) 1	7,30 %
b) 1	85,60 %
c) 1	5,3 %
d) 1	75,00 %

21) Fruktolyse 24 Std. nach Auftauen

weniger als 600 y/ml oder Anstieg

a) 90	25,74 %	0	95,0 %
82 ohne 0	28,02 %	2,6 %	95,0 %
b) 90	76,62 %	0	100,0 %
82 ohne 0	79,06 %	24,4 %	100,0 %
c) 90	9,84 %	0	64,6 %
82 ohne 0	10,85 %	2,1 %	64,6 %
d) 90	36,17 %	0	100,0 %
82 ohne 0	38,63 %	10,6 %	100,0 %

mehr als 600 y/ml

a) 14	37,27 %	1,9 %	78,5 %
b) 14	73,99 %	40,6 %	96,0 %
c) 14	12,91 %	1,9 %	39,3 %
d) 14	34,63 %	3,1 %	100,0 %

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
22) Alter			
unter 30 Jahren			
a) 29	31,66 %	0	88,7 %
28 ohne 0	32,79 %	1,9 %	98,7 %
b) 29	75,65 %	0	96,3 %
28 ohne 0	76,63 %	13,2 %	96,3 %
c) 29	14,56	0	69,3 %
28 ohne 0	15,13 %	3,5 %	69,3 %
d) 29	46,20	0	100,0 %
28 ohne 0	45,83 %	14,8 %	100,0 %
zwischen 30 und 50 Jahren			
a) 50	26,17 %	0	95,0 %
54 ohne 0	28,55 %	3,1 %	95,0 %
b) 59	67,83 %	0	100,0 %
54 ohne 0	74,13 %	24,3 %	100,0 %
c) 59	10,94 %	0	45,0 %
54 ohne 0	11,29 %	2,1 %	45,0 %
d) 59	41,93 %	0	100,0 %
54 ohne 0	39,38 %	13,4 %	100,0 %
Über 50 Jahre			
a) 16	20,46 %	0	49,4 %
14 ohne 0	23,38 %	6,3 %	49,4 %
b) 16	77,62 %	0	95,7 %
14 ohne 0	80,51 %	11,3 %	95,7 %
c) 16	7,45 %	0	90,0 %
14 ohne 0	9,63 %	1,2 %	90,0 %
d) 16	36,86 %	0	98,0 %
14 ohne 0	41,34	12,2 %	98,0 %

23) Die Lagerungszeit wurde nicht untersucht, da sie bei begrenzter Lagerungszeit (Monate) bei - 196 °C ohne Bedeutung sein soll.

Tabelle 2

Patientenzahl	Mittelwert	unterer	Grenzwert	oberer
24) Zeit bis Einfrieren				
weniger als 60 Min				
a) 15	21,55 %	0		79,4 %
12 ohne 0	29,36 %	4,7 %		79,4 %
b) 15	70,01 %	0		100,0 %
12 ohne 0	87,49 %	41,2 %		100,0 %
c) 15	10,51 %	0		56,4 %
12 ohne 0	11,88 %	3,1 %		56,4 %
d) 15	48,92 %	0		98,3 %
12 ohne 0	40,45 %	0		98,3 %
zwischen 60 und 120 Min				
a) 64	23,22 %	0		78,5 %
59 ohne 0	25,54 %	1,9 %		78,5 %
b) 64	68,68 %	0		99,6 %
59 ohne 0	74,45 %	23,4 %		99,6 %
c) 64	11,85 %	0		89,1 %
59 ohne 0	12,93 %	2,2 %		89,1 %
d) 64	51,42 %	0		100,0 %
59 ohne 0	50,67 %	0		100,0 %
mehr als 120 Min				
a) 17	28,94 %	2,6 %		95,0 %
b) 17	79,43 %	25,7 %		100,0 %
c) 17	11,62 %	1,2 %		96,0 %
d) 17	40,41 %	24,7 %		100,0 %

Zusammenfassend könnte man bemerken, daß zwar eine gewisse Kongruenz zwischen qualitativ gutem Spermia, bzw. Spermia mit besseren Ausgangswerten einerseits und hohen Überlebensraten andererseits besteht, daß aber diese Beziehung nicht obligat ist.

Teil II

Zur weiteren Untersuchung wurden die Überlebensraten von jeweils 20 beliebigen Ejakulaten mit 5 sehr guten bzw. 5 sehr schlechten Ausgangswerten zusammengestellt (s. Tabelle 3).

Kriterien für gute (A) und schlechte (B) Beurteilung:

A) Normospermie

hohe Spermiedichte
normales Spermiozytogramm
gute Spermienqualität
gute Motilitätsqualität

B) Oligospermie I - II

geringe Spermiedichte
pathologisch verändertes Spermiozytogramm
geringe Spermienqualität
geringe Motilitätsqualität

Bei diesen Ejakulaten wurden nur diejenigen in die Beurteilung aufgenommen, die eine 5-Std.-Überlebensrate hatten, die größer als 0 war.

Es ergab sich bei diesen Untersuchungen, daß die qualitativ guten Ejakulate eine um 10 % geringere Auftau-Überlebensrate als die qualitativ schlechteren hatten; die Werte für c) und d) waren ebenfalls geringer - nur b) ergab einen höheren Wert.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der aufgegliederten Überlebensraten von A : 20 sehr guten und B : 20 sehr schlechten Ejakulaten

	Mittelwert	unterer Grenzwert	oberer Grenzwert	Signifikanz A:B
A) a)	21,42 %	4,0 %	63,3 %	ja (90 %)
b)	82,81 %	49,2 %	100,0 %	nein
c)	8,14 %	1,6 %	27,8 %	nein
d)	38,02 %	4,8 %	100,0 %	nein

B) a)	31,36 %	9,6 %	95,0 %	ja (90 %)
b)	71,42 %	19,0 %	100,0 %	nein
c)	13,65 %	0	58,0 %	nein
d)	43,07 %	0	100,0 %	nein

Signifikanzbestimmung (Wilcoxon-Test): Wahrscheinlichkeit > 90 %

Teil III

Zur Ergänzung der ersten Teile wurde noch eine Zusammenstellung der erwähnten Fraktionen für diejenigen Ejakulate vorgenommen, die die besten Auftau-Überlebensraten hatten.

Voraussetzung: Überlebensrate größer als 40 %.

Tabelle 4: Aufgliederung von 29 Ejakulaten mit hoher Überlebensrate in die einzelnen untersuchten Fraktionen

Untersuchte Fraktion	Aufgliederung
1) Verflüssigungszeit	13 mehr als 20 Min 9 weniger als 15 Min 7 zwischen 15 und 20 Min
2) Enthaltene Tage	17 zwischen 4 und 7 Tagen 10 weniger als 4 Tage 2 mehr als 7 Tage
3) pH-Wert	29 im Normbereich
4) Ejakulatvolumen	28 mehr als 2 ml 1 weniger als 2 ml
5) Spermienqualität	15 Normospermie 7 Hypospermie 7 Oligospermie II

Tabelle 4:

Untersuchte Fraktion	Aufgliederung
6) Spermienmenge	18 mehr als 120 Mill 9 weniger als 50 Mill 2 zwischen 50 und 120 Mill
7) Spermienbeweglichkeit	20 mehr als 40 % 9 viel weniger als 40 %
11) Motilitätsqualität sofort	20 lebhaft 8 mäßig 1 schlecht
12) Motilitätsqualität nach 5 Std.	16 lebhaft 11 mäßig 2 schlecht
15) Differential- Spermio cytogramm	21 pathologisch verändert 8 im Normbereich
16) Initialfruktose	24 mehr als 1200 y/ml 4 weniger als 1200 y/ml
17) Fruktolyse in 5 Std.	25 weniger als 600 y/ml 4 etwa 600 y/ml
18) Fruktolyse in 24 Std.	14 weniger als 600 y/ml 9 mehr als 1000 y/ml 6 zwischen 600 und 1000 y/ml
22) Alter	14 zwischen 30 und 50 Jahren 11 unter 30 Jahren 4 über 50 Jahre
24) Zeit bis Einfrieren	24 zwischen 60 und 120 Min 4 mehr als 120 Min 1 weniger als 60 Min

Aus dieser Zusammenstellung läßt sich entnehmen, daß an guten Überlebensraten sowohl normale als auch pathologisch reduzierte Ejekulatfraktionen unter ungünstigen Voraussetzungen beteiligt sind.

DISKUSSION

Vor der Auswertung des vorliegenden Materials soll nochmals betont werden, daß diese Aussagen wohl nicht statistisch gewertet werden können. Die Zahl der Ejakulate - sowohl die der einzelnen Fraktionen als auch aller zusammen - ist zu gering, als daß das Ergebnis statistisch relevant sein könnte; die Arbeit soll ihren Sinn darin haben, wegweisend für weitere Forschungen zu sein.

Die Angaben, die wir bisher für Spermaqualitäten besitzen, beziehen sich zumeist auf gesunde junge Männer, und da ein Teil zumindest des zu lagernden Spermias von andrologischen Patienten - wie diesen hier - stammen wird, ist es wichtig, den Einfluß der Kryokonservierung auch auf dieses Sperma zu untersuchen. Die Überlebensrate normalen Spermias liegt nach Behrman und Ackerman zwischen 40 % und 90 % - die Gesamtüberlebensrate hier liegt bei 28 %. Wie ist diese Überlebensrate nun hier für die einzelnen Fraktionen, die untersucht wurden, aufgeteilt und verhält sie sich den andrologischen Normalwerten entsprechend?

Die Antwort, die auf Grund des vorliegenden Materials gegeben werden kann, lautet bejahend in Bezug auf einen Zusammenhang zwischen guter Überlebensrate und Normalwerten - jedenfalls für Teil I der Untersuchungen; für Teil II und III ergeben sich zwischen Normalwerten und Ergebnissen eher umgekehrt proportionale Beziehungen, die natürlich mit großen Einschränkungen zu sehen sind.

Zunächst sollen die einzelnen Überlebensraten (a) betrachtet werden, wobei als Vergleichswert die Gesamtüberlebensrate von 28 % (34 %) dienen soll (Prozentangaben auf volle Zahlen abgerundet; in Klammern hinter den Zahlen stehen die Werte, die - wie auf S. 24 ausgeführt - den Spermata entsprechen, die nach 5 Std. eine Überlebensrate von mehr als 0 % hatten.

Die Ejakulatfraktionen mit den besseren Überlebensraten sind auf die linke Seite der Tabelle 5 geschrieben, die mit den schlechteren auf die rechte Seite; anschließend in den Tabellen 6, 7 und 8 werden die Fraktionen qualitativ aufgeführt.

Tabelle 5: Darstellung der in ihre Fraktionen aufgeteilten
untersuchten Faktoren - Gegenüberstellung der
Fraktionen mit den besseren Überlebensraten gegen-
über denen mit den schlechteren Überlebensraten

bessere Überlebensraten	schlechtere Überlebensraten
1) Verflüssigungszeit 33 % (32 %) mehr als 20 Min	30 % (29 %) 15 bis 20 Min 23 % (27 %) weniger als 15 Min
2) Enthaltene Tage 35 % (32 %) weniger als 4 Tg.	28 % (29 %) 4 bis 7 Tage 19 % mehr als 7 Tg.
5) Spermaqualität 31 % Normospermie	29 % Hypospermie 26 % (33 %) Oligospermie II 17 % Oligospermie I
6) Spermienzahl total 31 % mehr als 120 Mill	24 % (33 %) weniger als 30 Mill 18 % 30 bis 120 Mill
7) Spermienbeweglichkeit 28 % mehr als 40 % bzw	24 % (31 %) weniger als 40 %
11) Motilitätsqualität sofort 32 % mäßig	29 % lebhaft 8 % (24 %) schlecht
12) wie 11), nach 5 Std. 32 % lebhaft	23 % mäßig 17 % (26 %) schlecht
13) wie 11), nach Auftauen 50 % lebhaft	30 % mäßig 16 % (20 %) schlecht
14) wie 13) nach 5 Std. 49 % lebhaft	30 % mäßig 21 % (24 %) schlecht
15) Diff.-Spermiozytogramm 27 % (31 %) pathologisch	25 % normal
16) Initialfructose 41 % weniger als -	23 % (25 %) mehr als 1200 y/ml
17) Fruktolyse in 5 Std. 33 % etwa 600 y/ml	26 % (28 %) weniger als 600 y/ml 20 % (30 %) mehr als 600 y/ml
18) Fruktolyse in 24 Std. 32 % (32 %) mehr als 600 y/ml	23 % (25 %) weniger als 600 y/ml

Tabelle 5

bessere Überlebensraten	schlechtere Überlebensraten
19) wie 16), nach Auftauen 32 % (33 %) viel weniger als-	24 % (27 %) mehr als 1000 y/ml
20) wie 19), nach 5 Std. 39 % etwa 600 y/ml	27 % (29 %) bis 400 y/ml 26 % (30 %) Anstieg oder 0 y/ml
21) wie 18) nach Auftauen 37 % mehr als 600 y/ml	26 % (28 %) weniger als 600 y/ml
22) Alter 32 % (33 %) weniger als 30 J.	26 % (29 %) 30 bis 60 Jahre 20 % (23 %) älter als 50 Jahre
24) Zeit bis Einfrieren 29 % mehr als 120 Min.	23 % (26 %) 60 bis 120 Min 22 % (29 %) weniger als 60 Min

Wie schon vorher gesagt, zeigt es sich, daß die Ejakulatfraktionen sich etwa entsprechend den andrologischen Normalwerten verhalten: Bei den im Normalbereich liegenden Werten zeigen sich relativ gute Ergebnisse der Überlebensraten.

Die gleiche Aufstellung wie in Tabelle 5, jedoch in qualitativer Reihenfolge zeigt die Tabelle 6:

Tabelle 6: Darstellung der Spermafraktionen mit den besseren Überlebensraten in qualitativer Reihenfolge ohne Berücksichtigung der "ohne 0"-Werte

Spermafraktion	Überlebensrate
1. 16) Initialfruktose weniger als 1200 y/ml	41 %
2. 2) Enthaltssame Tage weniger als 4	35 %
3. 1) Verflüssigungszeit mehr als 20 Min	33 %
17) Fruktolyse nach 5 Std. etwa 600 y/ml	33 %
4. 11) Motilitätsqualität sofort mäßig	32 %
12) " nach 5 Std. lebhaft	32 %
18) Fruktolyse nach 24 Std. mehr als 600 y/ml	32 %
22) Alter unter 30 Jahren	32 %
5. 5) Spermienqualität Normospermie	31 %
6) Spermienzahl total mehr als 120 Mill.	31 %
6. 24) Zeit bis Einfrieren mehr als 120 Min	29 %
7. 7) Spermienbeweglichkeit mehr als 40 %	28 %
8. 15) Diff.-Spermiecytogramm abweichend	27 %

Bei Berücksichtigung der "ohne 0"-Werte sieht diese Reihe kaum anders aus:

Tabelle 7: Darstellung der Spermafraktionen mit den besseren Überlebensraten in qualitativer Reihenfolge mit Berücksichtigung der "ohne 0"-Werte

1.	16) Initialfruktose weniger als 1200 y/ml	41 %
2.	2) Enthaltene Tage weniger als 4	35 %
3.	1) Verflüssigungszeit mehr als 20 Min	33 %
	6) Spermienzahl total weniger als 50 Mill	33 %
	17) Fruktolyse nach 5 Std. etwa 600 y/ml	33 %
	22) Alter unter 30 Jahren	33 %
4.	5) Spermaqualität Oligospermie II	32 %
	11) Motilitätsqualität sofort mäßig	32 %
	12) Motilitätsqualität nach 5 Std. lebhaft	32 %
	18) Fruktolyse nach 24 Std. mehr als 600 y/ml	32 %
5.	7) Spermienbeweglichkeit weniger als 40 %	31 %
	15) Diff.-Spermioctogramm pathologisch	31 %
6.	24) Zeit bis Einfrieren weniger als 60 Min	29 %

Die gleiche qualitative Aufstellung der Werte, nur in negativer Reihenfolge zeigt:

Tabelle 8: Darstellung der Spermafraktionen mit den schlechteren Überlebensraten in qualitativer Reihenfolge

1.	11) Motilitätsqualität sofort schlecht	8 %
2.	5) Spermienqualität Oligospermie I	17 %
	12) Motilitätsqualität nach 5 Std. schlecht	17 %
3.	6) Spermienmenge total 50 bis 120 Mill	18 %
4.	2) Enthaltene Tage mehr als 7	19 %
5.	17) Fruktolyse nach 5 Std. viel mehr als 600 y/ml	20 %
	22) Alter über 50 Jahre	20 %
6.	24) Zeit bis Einfrieren weniger als 15 Min	22 %
7.	1) Verflüssigungszeit weniger als 15 Min	23 %
	16) Initialfruktose mehr als 1200 y/ml	23 %
	18) Fruktolyse nach 24 Std. weniger als 600 y/ml	23 %
8.	7) Spermienbeweglichkeit weniger als 40 %	24 %
9.	15) Diff.-Spermioctogramm normal	25 %

Zum Vergleich wurde auch eine Beurteilung der Überlebensrate 5 Std. nach dem Auftauen (c) zusammengestellt und es zeigte sich eine der Auftau-Überlebensrate entsprechende qualitative Verteilung zwischen 10 % und 15 %. Unter diesen Zahlen liegende Werte, wie bei Oligospermie II: 6 % oder schlechter Ausgangsmotilität: 6 % haben ihre Entsprechung bei der Überlebensrate (a); entsprechend auch über diesen Zahlen liegende Werte.

Ein entsprechender Vergleich mit der Überlebensrate nach 5 Std. (b) ergab kein korrelierendes Verhalten.

Bei der Gegenüberstellung von "guten gegenüber schlechten" Ejakulaten ergab es sich, daß die "schlechten" relativ bessere Überlebensraten zeigten. Die 5 Std.-Überlebensrate war zwar besser bei den "guten", die anderen Ergebnisse

a) Auftau-Überlebensrate: schlecht 31 % ; gut 21 %

b) 5 Std.-Überlebensrate: schlecht 14 % ; gut 8 %

lassen gemäß dieser Untersuchung nur die Folgerung übrig, daß für die Kryospermakonservierung nicht nur "gute", sondern auch "schlechte" Ejakulate mit relativ guter Überlebensrate zur Anwendung kommen können. Dieser Schluß wird auch durch die Ergebnisse des Teil I nicht verworfen - Teil III bestätigt ihn in hohem Maße.

Die Gegenüberstellung der verschiedenen Spermafraktionen in Teil III zeigt in Bezug auf hohe Überlebensraten zwar ein Vorherzählen der "normalen" Ejakulate, es zeigt sich jedoch, daß auch zu einem nicht geringen Prozentsatz die vom Normalen abweichenden Ejakulate an dieser Aufstellung teilhatten.

Die sich aus diesen Untersuchungen ergebenden Folgerungen sind folgende:

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund der Untersuchungen an 104 Ejakulaten verschiedener Qualität zeigte es sich, daß diese Ejakulate nach der Konservierung in flüssigem Stickstoff unterschiedliche Überlebensqualitäten zeigten, wobei diese Aussage hauptsächlich auf Grund der Überlebensraten der einzelnen Spermata gemacht wurde.

Es ergab sich keine strenge Relation zwischen qualitativ gutem Sperma einerseits und qualitativ schlechtem Sperma andererseits mit den entsprechenden Überlebensraten.

Die Überlebensraten für alle Spermata betragen:

5 Std. nach der Ejakulation	78 %
nach dem Auftauen	28 %
5 Std. nach dem Auftauen	12 %.

Zwischen der Überlebensrate 5 Std. nach Ejakulation und der Auftau-Überlebensrate scheint es keine Relation zu geben, es zeigt sich jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen der Überlebensrate 5 Std. nach dem Auftauen und der direkt nach Auftauen; zwischen der Überlebensrate 5 Std. nach Ejakulation und der 5 Std. nach dem Auftauen wieder scheint auch keine Relation zu herrschen.

Die unterschiedlichen Überlebensraten werden durch verschiedene bestimmende Faktoren erzeugt, von denen die hier untersuchten qualitativ aufgeschlüsselt und aufgeführt sind.

Nach Erfassung aller bestimmenden Faktoren wird es in Zukunft vielleicht möglich sein, die Gefrierfähigkeit eines Ejakulates vorauszusagen und die Gefrierfähigkeit eines Ejakulates zu verbessern.

Bis dahin werden jedoch noch große Ejakulatkollektiva untersucht werden müssen, und zwar nicht nur in spermatologischer Hinsicht, sondern auch in cytologischer, cytogenetischer und mikrobieller Hinsicht.

Wenn dann auch noch eine echte Möglichkeit geschaffen ist, die Fertilisationsfähigkeit eines Spermas zu messen, wird die Kryospermatologie eine vitale Rolle spielen können - jedenfalls in ihrem Indikationsbereich.

LITERATUR

1. Ackerman, D.R. The effect of cooling and freezing on the aerobic and anaerobic lactic acid production of human semen
Fertility & Sterility, 19, 123, 1968
2. Ackerman, D.R.: Glycerol metabolism in untreated, cold-shocked and frozen human spermatozoa
Cryobiology, 7, 145, 1970
ref. Excerpta Medica (S. 4)
3. Ackerman, D.R.: Variation due to freezing in the citric acid content of human semen
Fertility & Sterility, 22, 58, 1971
4. Ackerman, D.R.: Glycerol metabolism in untreated, cold-shocked and frozen human spermatozoa
Excerpta Medica, Obstetrics and Gynaecology, 25, 39, 1972 (ref)
5. Amelar, R.D. and The split ejaculate
R.S. Mutchkies: Fertility & Sterility, 16, 46, 1965
6. Angeloff, L.G. and Programmed freezing
J.W.D. Henderson: Cryobiology, 6, 368, 1970
7. Behrman, S.J. and Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid nitrogen refrigerator
Y. Sawada: Fertility & Sterility, 17, 457, 1966
8. Behrman, S.J. and Freeze preservation of human sperm
D.R. Ackerman: American Journal of Obstetrics & Gynecology, 103, 654, 1969
9. Brøndtson, W.E. and The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol
R.H. Foote: Cryobiology, 5, 398, 1969
10. Blom, E.: A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin
Fertility & Sterility, 1, 176, 1950

11. Borelli, S.: Potenz und Potenzstörungen des Mannes
Verlag Brüder Hartmann, Berlin 1971
12. Boyd, R.: Indications for and techniques of
artificial inseminations in man
In Excerpta Medica Int. Congr. Ser.,
133, 855, 1967
13. Brown, K.I., B.G.Crabo, Some factors affecting loss of intra-
cellular enzymes from spermatozoa
E.F. Graham and
M.M. Pace: Cryobiology, 8, 220, 1971
14. Bunge, R.G. and Frozen human semen
J.K. Sherman: Fertility & Sterility, 5, 193, 1954
15. Bunge, R.G., Clinical use of frozen semen
W.C. Keettel and
J.K. Sherman: Fertility & Sterility, 5, 520, 1954
16. Bunge, R.G.: Some observations on the male ejaculate,
Fertility & Sterility, 21, 50, 1970
17. Davenport, L.B.: Experimental morphology,
2nd ed. chapter 7,
Macmillan Co., New York, 1908
18. Deminatus, F.: Fortschritt in der Sperma-Tiefkühltechnik
(-79 °C) durch ein halbautomatisches Ein-
friergerät
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift,
66, 466, 1959
19. Döring, K.G.: Die homologe künstliche Insemination
Der Gynäkologe, 3, 152, 1971
20. Eibl, K., H.F. Zoder Samenkonservierung mittels Kohlensäure
und R. Rahn: Deutsche Tierärztliche Wochenschrift,
66, 1, 1959
21. Fernandez-Cano, L., Refrigerant preservation of human
Miriam F. Menkin, spermatozoa, I
C.-R.Garcia, J. Rock: Fertility & Sterility, 15, 390, 1964

22. Forgeson, J.L.,
W.T. Berry and
D.E. Goodwin: Freezing bull semen in liquid Nitrogen
vapor without instrumentation
Journal of animal science, 20, 970, 1961
23. Graham, E.F. and
M.M. Pace: Some biochemical changes in spermatozoa
due to freezing
Cryobiology, 4, 75, 1967
24. Hempel, K.E. and
A. Levan: Breakage in human chromosomes induced by
low temperature
Hereditas, 51, 315, 1964
25. Herman, H.A. and
F.W. Madden: The artificial inseminations of dairy
and beef cattle
Lucas Bros., Columbia, 1963
26. Hoagland, H. and
G. Pincus: Revival of mammalian sperm after
immersion in liquid nitrogen
The Journal of General Physiology,
25, 337, 1942
27. Hodapp, E.L.: Revival of frogs spermatozoa vitrified
in liquid air
Proceedings of the Society for Experimental
Biology and Medicine, 39, 433, 1938
28. Hornstein, O.P.: Behandlung einiger wichtiger Fertilitäts-
störungen des Mannes
Der Naturarzt, 22, 373, 1971
29. Iizuka, R., Y.Sawada: Successful inseminations with frozen
human semen
Japanese Journal of Fertility & Sterility,
3, 1, 1958
30. Jahnel, F.: Über die Widerstandsfähigkeit von mensch-
lichen Spermatozoen gegenüber starker
Kälte
Klinische Wochenschrift, 17, 1273, 1938

31. Kaden, R.: Diagnostik andrologischer Störungen in Praxis und Klinik
Der Urologe, B. 1, 6, 1970
32. Kaden, R.: Kryosperma zur Insemination
Vortrag Sitzung der Deutschen Gesellschaft für Familienplanung, Berlin, 1970
33. Kaden, R. und P. Mortler: Einführung in die andrologische Labor-
diagnostik bei Fortpflanzungsproblemen des Menschen
Berliner Ärztekammer, 7, 270, 1970 und 8, 154, 1971
34. Kaden, R.: Andrologische Methodik bei Fortpflanzungs-
problemen des Menschen
Medizinische Welt, 23, 107, 1972
35. Kaden, R., K. Gross- Kryospermaforschung und andrologische
gebauer, K. Sperling Praxis
und K. Sokol: Arch.Dermat. Forschung, 244, 443, 1972
36. Karow, A.M. and W.R. Webb: Tissue freezing. A theory for injury
and survival
Cryobiology, 2, 99, 1965
37. Keettel, W., R.G. Bunge, Report of pregnancies in infertile
J.T. Bradbury and couples
W.O. Nelson: The Journal of American Medical
Association, 160, 102, 1956
38. Kirchhoff, H.: Künstliche heterologe Insemination
Deutsches Ärzteblatt, 5, 335, 1970
39. Luyet, B.J.: Freezing and drying
Harris, R.J.C., Ed. S. 77
Hafner New York, 1952

40. Mann, T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract
Methuen and Co. Ltd., London, 1964
41. Mantegazza, P.: Fisiologia sullo sperma umano
Rendic. reale Ist. Lomb., 3, 183, 1866
42. Matheson, G., L. Carlborg and C. Gemzell: Frozen human semen for artificial insemination
American Journal of Obstetrics & Gynecology, 104, 495, 1969
43. Menkin, Miriam F., P. Lusia, J.P. Zaikis and J. Rock: Refrigerant preservation of human spermatozoa, II
Fertility & Sterility, 15, 511, 1964
44. Meryman, H. and E. Kefig: Survival of spermatozoa following drying
Nature, 184, 470, 1959
55. Meryman, H.T.: Cryoprotective agents
Cryobiology, 8, 173, 1971
46. Nath, J. and J. Patt jr.: Biochemical changes associated with freezing in ram semen
Cryobiology, 6, 522, 1970
47. Nath, J.: Correlative biochemical and ultra-structural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen
Cryobiology, 8, 385, 1971
48. Patt, J.A. and J. Nath: Effects of diluents, equilibration time and freezing rates on the storage of ram semen
Cryobiology, 5, 385, 1969
49. Pawlow, G.N.: Effect of low temperatures on the spermatozoa
Russian Journal of Physiology, 10, 291, 1927

50. Pedersen, H. and P.E. Lebech: Ultrastructural changes in the human spermatozoa after freezing for artificial insemination
Fertility & Sterility, 22, 125, 1971
51. Perloff, W.H., E. Steinberger and J.K. Sherman: Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic,
Fertility & Sterility, 15, 501, 1964
52. Persidsky, M.D. and M.H. Ellet: Lysosomes and cell cryoinjury
Cryobiology 8, 345, 1971
53. Polge, C., A.U. Smith and A.S. Parkes: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures
Nature 164, 666, 1949
54. Prévost, J.L.: Recherches sur les animalcules spermatozoaires. Recherches sur les changements de forme que présentent les zoospermes chez certains Batraciens
C.R.Acad. Sci. Paris, 11, 907, 1840
55. Pursei, V.G., L.A. Johnson and R.J. Gerrits: Distribution of glutamic oxalacetic transaminase and lactic dehydrogenase activities in boar semen after cold shock and freezing
Cryobiology 7, 141, 1970
56. de Quatrefages, A.: Recherches sur la vitalité des spermatozoïdes de quelques poissons d'eau douce
Ann. Sci. Nat., 19, 341, 1853
57. Rohloff, D.: Tiefgefrierung von Ebersperma in Pelletform bei - 196 °C
Zuchthygiene, 2, 75, 1967
58. Sawada, Y.: Studies on the freezing preservation of human spermatozoa
Japanese Journal of Fertility & Sterility, 4, 1 1959

59. Sawada, Y.,
D.R. Ackerman and
S.J. Behrman: Motility and respiration of human sperma-
tozoa after cooling to various low
temperatures
Fertility & Sterility, 18, 775, 1967
60. Schaad, G.: Über die therapeutische heterologe In-
semination in Deutschland
Schleswig-Holsteinisches Ärzteblatt, 1, 1970
61. Schaad, G.: Leserbrief
Medical Tribune, 7, 66, 1972
62. Schaffner, C.S.: Longevity of fowl spermatozoa in frozen
conditions
Science 96, 337, 1942
63. Schenk, S.L.: Über den Einfluß niedriger Temperaturgrade
auf einige Elementarorganismen
Sitzungsberichte der Wiener Akademie
60, 25, 1870
64. Schmidt, D.: Versuche über die Gefrierkonservierung von
Bullen-, Ziegenbock- und Schafbockesperma
in Pelletform
Fortpflanzung der Haustiere, 4, 172, 1968
65. Schirren, C.: Die kinderlose Ehe
Fortschritte der Medizin, 88, 1047, 1970
66. Schirren, C.: Praktische Andrologie
Verlag Brüder Hartmann, Berlin 1971
67. Sherman, J.K. and
R.G. Bunge: Observations on preservation of human
spermatozoa at low temperatures
Proceedings of the Society for Experi-
mental Biology and Medicine, 82, 686, 1953
68. Sherman, J.K.: Freezing and freeze-drying of human
spermatozoa
Fertility & Sterility, 5, 357, 1954

69. Sherman, J.K.: Temperature shock in human spermatozoa
Proceedings of the Society for Experimental
Biology and Medicine,
88, 6, 1955
70. Sherman, J.K.: Temperature shock in mammalian Sperma-
tozoa
Fed. Proc., 19, 178, 1960
71. Sherman, J.K.: Survival of higher animal cells after the
formation and dissolution of intracellu-
lar ice
Anat. Rec., 144, 171, 1962
72. Sherman, J.K.: Improved methodes of preservation of human
spermatozoa by freezing and freezedrying
Fertility & Sterility, 14, 49, 1963
73. Sherman, J.K.: Questionable protection by intracellular
glycerol during freezing and thawing
Journal of Cell. Comp. Physiol., 6, 167, 1963
74. Sherman, J.K.: Effect of size of intracellular ice on
consumption and nuclear alteration of
mouse kidney cells
Anat. Rec., 149, 591, 1964
75. Sherman, J.K.: Research on frozen human semen
Fertility & Sterility, 15, 485, 1964
76. Sherman, J.K.: Low temperature research on spermatozoa
an eggs
Cryobiology, 1, 103, 1964
77. Sherman, J.K.: Freeze-thaw-induced latent injury as a
phenomenon in cryobiology
Cryobiology, 3, 407, 1967

78. Shettles, L. B.: The respiration of human spermatozoa and their response to various gases and low temperatures
American Journal of Physiology,
128, 408, 1940
79. Sillo-Seidl, G.: Chancen und Möglichkeiten der künstlichen Samenübertragung
Ärztliche Praxis, 4, 2947, 1967
80. Sokol, K.: Vorrichtung zum Einfrieren von Sperma
Patentschrift und Patent, 1958, 1960
81. Sokol, K.: Humanspermakonservierung
Schweizerische Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe, 1, 221, 1970
82. Sokol, K. und R. Kaden: Entwicklung und Technik der Kryospermakonservierung
Arch. Dermat. Forschung, 244, 441, 1972
83. Sokol, K., R.Kaden, K. Sperling und K. Grossgebauer: Kryospermaforschung
Fortschritte der Medizin, 27, 1021, 1971
84. Sokol, K.: Prospektive Praxis - Zeugungsvorsorge
Sexualmedizin, 3, 150, 1972
85. Spallanzani, L.: Opusculi di Fisica animale e Vegetabile.
Opusculo II Osservazioni, e Sperienze intorno Ai Vermicelli Spermatici dell'Uomo e degli Animali.
Moderna, 1776
86. Sperling, K. und R. Kaden: Meiotic studies of the ejaculated seminal fluid of humans with normal sperm count and oligospermia,
Nature, 232, 481, 1971

87. Stinsny, H.: Unfruchtbarkeit beim Manne
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1944
88. Stoye, H., R. Mehler und M. Diekmann: Versuche zur Verlegung des Auftauvorganges von Tiefgefriersperma ins weibliche Genitale beim Rind
Zuchthygiene, 2, 2, 1967
89. Thurston, R.J. and G.C. Harris: Calcium-45 uptake as a measurement of freeze-thaw injury to chicken spermatozoa in the presence or absence of cryo-preserved
Cryobiology, 7, 100, 1970
90. Tyler, E.T.: Report
Medical Tribune, 6, 1, 1971
91. Wacker, A.: Utopisches Denken in Biochemie und Medizin
Wiener medizinische Wochenschrift 43/44, 751, 1971
92. Wales, R.G. and I.G. White: The interaction of pH, tonicity and electrolyte concentration on the motility of fowl spermatozoa
Australian Journal of Biological Sciences 1, 177, 1958
93. Wales, R.G. and I.G. White: The susceptibility of spermatozoa to temperature shock
Journal of Endocrinology, 19, 211, 1959
94. Wales, R.G. and T. O'Shea: The deep freezing of rabbit spermatozoa,
Australian Journal of Biological Sciences 21, 331, 1968
95. Walker, P.J. and M.J. Ashwood-Smith: Dimethyl sulphoxide, an alternative to glycerol for the low-temperature preservation of trypanosomes
Ann. Trop. Med. Parasit, 55, 93, 1961

96. Wake, H.: The study of the practical use of human frozen spermatozoa
Japanese Journal of Fertility & Sterility, 6, 66, 1961
97. Webb, W.R. and A.M. Karow: jr.: Hypothermic organ preservation
The Journal of American Medical Association, 191, 1012, 1965
98. White, I.G., A.W. Blackshaw and C.W. Emmens: Metabolic and motility studies relating to the low temperature storage of ram and bull spermatozoa,
Aust. Vet. Journal, 30, 85, 1954
99. Wille, R.: Künstliche heterologe Insemination
Deutsches Ärzteblatt, 5, 337, 1970
100. Zamboni, L. and M. Stefanini: On the configuration of the plasma membrane of the mature spermatozoa
Fertility & Sterility, 19, 570, 1968
- 101: Zimmerman, S., Maureen B. Maude and M. Moldawer: Freezing and storage of human semen in 50 healthy medical students
Fertility & Sterility, 15, 505, 1964

Für die freundliche Hilfsbereitschaft und Beratung während der Durchführung der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Kaden herzlich bedanken.

Fräulein von Arnoldi und Fräulein Genschow danke ich für ihre Unterstützung bei den Untersuchungen.

Mein weiterer Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch deren Sachhilfen die Voraussetzungen für die Untersuchungen geschaffen wurden.

Weiterhin danke ich der Abteilung für Medizinische Statistik und Dokumentation im Klinikum Steglitz für ihre Beratung.

Ich wurde am 30. September 1947 in Ostberlin geboren und besuchte von 1954 bis 1958 die Volksschule. Von 1958 bis 1960 besuchte ich das Gymnasium Canisius Colleg in Westberlin; nach der Übersiedlung unserer Familie nach Westdeutschland besuchte ich das Gymnasium Paulinum in Münster/Westf., an dem ich am 5. November 1966 das Abitur bestand. Nach Absolvierung der Bundeswehrzeit - bis zum Herbst 1967 - studierte ich an der Freien Universität Berlin Humanmedizin. Am 18.3.1970 bestand ich das Physikum und am 26.7.1973 das medizinische Staatsexamen.

